

Identification of Fungi

Week 8

Methods for the Identification of Fungi

- 1-) Anamnesis
- 2-) Clinical Findings
- 3-) Necropsy Findings
- 4-) Intradermal Skin Tests
- 5-) Clinical Samples

5-) Clinical Samples

- In dermatophytes the hair and skin scraping samples can be used
- Exudates, biopsy and tissues
- Tissues can be helpful in histopathology especially to observe tissue reactions
- The correct match of histopathological findings and isolated fungi will confirm the diagnosis

a) Direct microscopy

b) Isolation

c) Identification

- Colony characteristics
- Investigation of macroconidiums
- Biochemical tests for the specific dermatophyte and yeasts

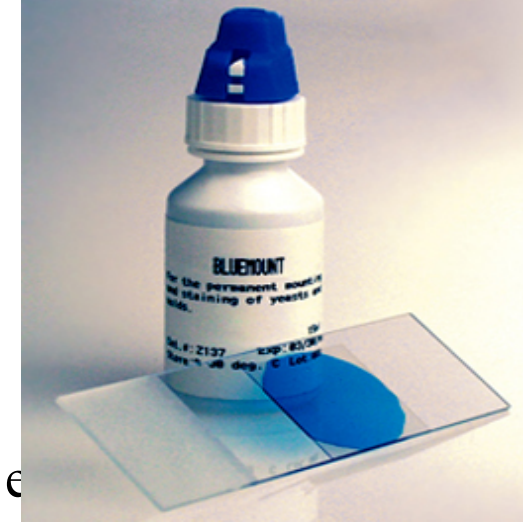
a-) Direct Microscopy of Fungi

Teknik	Kullanım Amacı	Mantarlar
%10-20 KOH preparasyonu	Örnekleri temizleyerek mantarları görülür hale getirir	Çoğu mantar ve maya, dimorfik formlar, dokulardaki maya benzeri formlar, kıl ve saç örneklerinde artrosporlar
Calcofluor beyazı (%0.1)	UV mikroskopta fungal elementlerin floresansı	Sürme preparatlar ve doku kesitlerinde mantar saptanması
Nigrosin veya Hint boyası	Cerebrospinal sıvı ya da temiz eksudatlar	<i>Cryptococcus neoformans</i> karakteristik kapsülü
Gram boyama / metilen mavisi	Fikse edilmiş doku ve eksudatlar	<i>Candida albicans</i> gibi maya hücrelerini görüntülemek
Fluoresan Antikor Tekniği	Dondurulmuş seksiyonlar / fikse edilmiş sürme preparatlar	<i>Blastomyces dermatitidis</i> gibi dimorfik mantarlarda
Periodik asit-Schiff (PAS) + kontrast boya (hematoksilin)	Biyopsi veya dokulardan hazırlanmış parafinli / dondurulmuş dokular	Çoğu mantarlar dokularda pembe renkli boyanır + doku reaksiyonları
Metanamine gümüş + kontrast boya	“	Çoğu mantarlar dokularda kahverengi boyanır
Wright / Giemsa boyası	Fikse edilmiş kemikiliği sürmeleri, biyopsi tuşe preparatları	<i>Histoplasma capsulatum</i>
Laktofenol Pamuk Mavisi	Mantar Etkenleri	Çoğu mantar ve maya, dimorfik formlar, dokulardaki maya benzeri

Teknik	Kullanım Amacı	Mantarlar
Hair Perforation Test	Saç ve kıllarda meydana gelecek perforasyona göre değerlendirme yapılır.	Microsporum canis, M. equinum ve Trichophyton mentagrophytes – T. rubrum arasında ayırım yapmak için kullanılır.
Wood's Lamp Uygulaması	Saç ve kılların, dermatofitlerle infekte olduğu durumların tespitinde kullanılarak tespit edilmesinde kullanılır.	Karanlık bir odada, kıllara tutunmuş sporların sarı yeşil renkli floresan yansıması ile tespit edilmesi esasına dayanır.
Hayvan İnokulasyon Tekniği	Yapay besiyeri ortamlarında saf kültürler elde edilir. Beyaz fareler ve guinea pig tercih edilir.	Klinik materyallerden izole edilmiş mantar etkenleri, hayvan etik komitesinin izni ile laboratuvar hayvanlarına inokule edilir
Serolojik Testler	Spesifik mantar antikorları tespit edebilir.	İmmun sistem baskılanmış hastalarda da hiç antikor olmayabilir ya da çok düşük miktarda üretilir.
Moleküler Biyoteknolojik Yöntemler	Güncel ve alternatif yaklaşım. Daha spesifik, kesin sonuç alınabilir.	Çoğu mantar ve maya, dimorfik formlar, dokulardaki maya benzeri formlar

Lactophenol Cotton Blue

Phenol crystal	20 g.
Lactic aside	20 cc.
Glycerin	40 cc.
Distilled water	20 cc.
Cotton blue	0.0075 g.

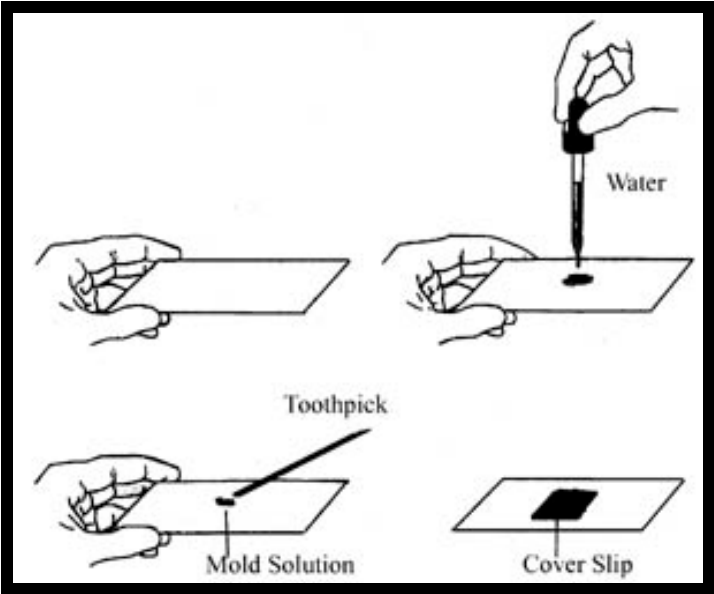


-Fenol kristal, distile su içinde hafifçe ısıtılarak e bileşenler katılır.

-Solusyonun içindeki laktik asit özellikle mantar elementlerinin muhafazasında, fenol mantarların öldürülmesinde ve pamuk mavisi (anilin mavisi) de boyamada görev alarak iyi bir görünüm sağlar.

-Temiz bir lam üzerine bir damla **Laktofenol Pamuk Mavisi** solüsyonu konur. Üzerine kıl örnekleri ya da besiyerinde üremiş mantar kolonisi parçası küçük bir üçgen şeklinde örneklendikten sonra konarak üzerine lamel kapatılır ve mikroskopta muayene edilir.

Slide preparation with lactophenol cotton blue

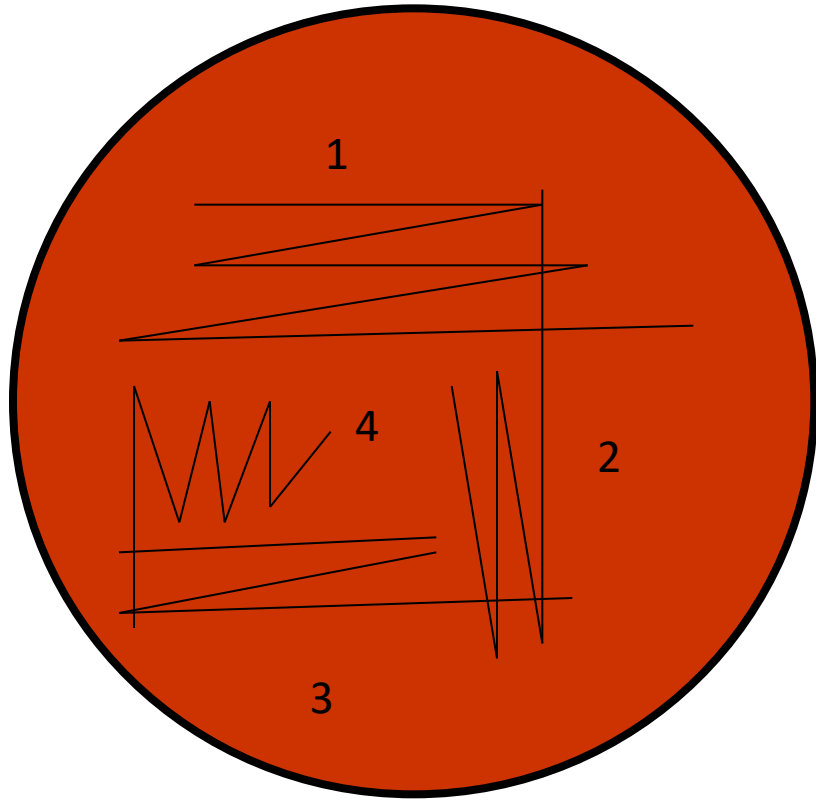


b-) Mantar İzolasyonu ve Pasajlanması

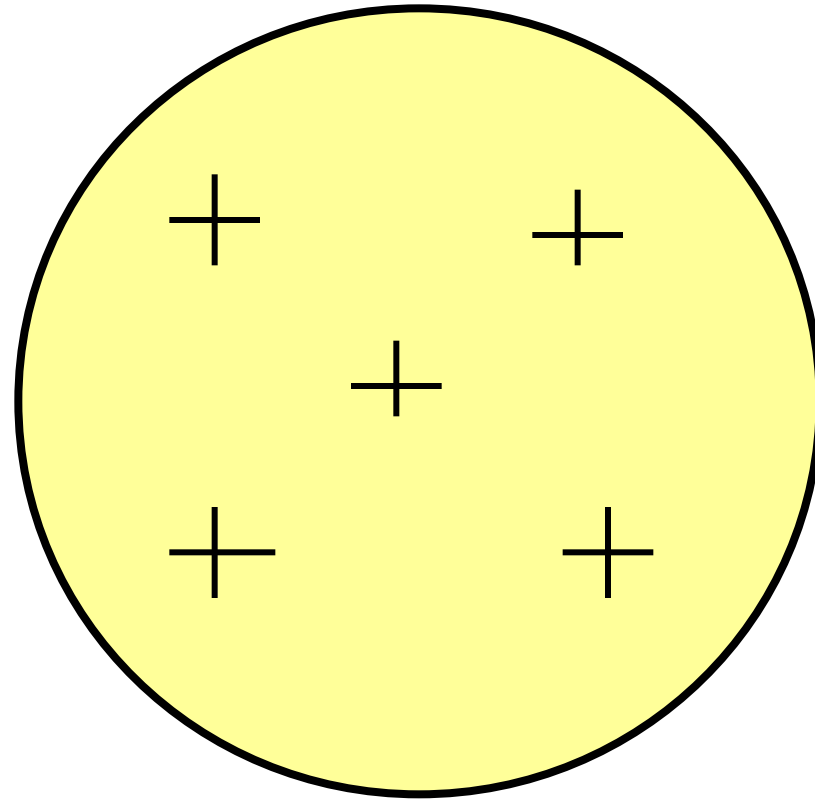
- Klinik örneklerden patojen mantar izolasyonunda kullanılan besiyerinin daha hızlı üreyen bakteri ve kontaminant mantarlara karşı selektif olması gerekir.
- En çok kullanılan besiyeri: **Sabouraud Dextrose Agar !!!**
- pH'sı 5.6 olup aside tolerans gösteren mantarların üremesini desteklerken bakterileri inhibe eder.
- Bu besiyerine kloramfenikol (antibakteriyal) ve cycloheximide (actidione, antifungal) eklenerek daha da selektif hale getirilebilir.
- Dimorfik mantarlarda %5 koyun kanlı brain-heart infusion agar kullanılır. Bu besiyeri 37°C'de inkube edildiğinde miselyal formdan maya formuna geçiş şekillenir.
- Trichophytonlar için maya ekstraktı (üretme faktörü), kloramfenikol (0.05 g/l) ve sikloheksimid (0.4 g/l) katılır.
- 37°C'de inkubasyon başlı başına bir selektif prosedürdür. Hayvansal dokuları invaze eden patojenler bu sıcaklığı tolere edebilir.

Besiyerine İnokulasyon

- Mayalar aynı bakterilerde olduğu gibi klinik ya da nekropsi materyalinden hazırlanan inokulum besiyeri yüzeyine öze yardımıyla inokule edilir.
- Mantar izolasyonunda, besiyeri yüzeyinde 5 noktada steril bir bistüri ile artı şeklinde ekim alanları oluşturulur. Daha sonra küçük lezyonlu doku parçaları, deri kazıntı örnekleri veya tüyler bu artı şeklindeki alanlarda agara hafifçe batırılır.
- Eğer örnekler agara direkt batırılırsa uzun süreli inkubasyonlarda agarda yarıma, parçalanma gerçekleşebilir.
- Mayalar aynı bakterilerde olduğu şekilde yeni besiyerine öze ile pasajlanır.



Maya inokulasyonu



Mantar inokulasyonu

Mantarların Subkültürü

Eğer mantar kolonisi sporlanıyorsa;

- Mantar kolonileri genellikle merkezinden çevresine doğru spor üretmeye başlar ve sıklıkla bir koloniye karakteristik rengini veren sporlardır.
- Bir öze öncelikle steril bir agar porsiyonu yüzeyine daldırılarak hafifçe nemli ve yapışkan hale getirilir, daha sonra bir koloniden sporları toplamak için kullanılır.
- Eğer mantar türü hızlı üreyen bir mantar ise inokulum yeni bir pleyt yüzeyinde tam merkeze gelen noktada, hemen agar yüzeyinin altına inokule edilir.
- Eğer mantar yavaş üreyen küçük koloniler oluşturuyorsa agar pleyt dört porsiyona bölünür ve her bir kısma ayrı ekim yapılır.

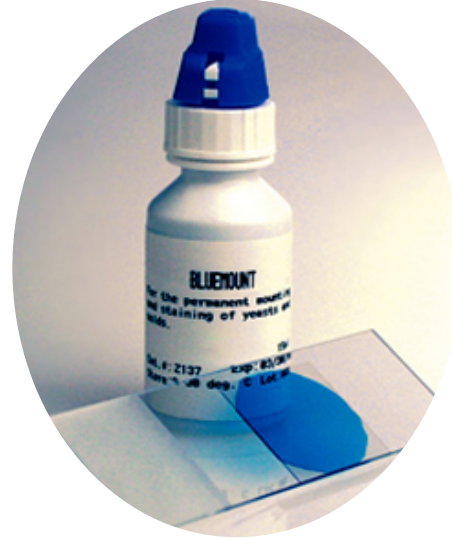
Mantarların Subkültürü

Eğer mantar kolonisi sporlanmıyorsa;

- Mantar kolonilerinde eskime ve ölüm aşaması koloninin merkezindeki hifa ile başlar. Bu nedenle, koloninin kenarındaki hifanın pasajlanması gerekmektedir.
- Steril bir bistüri ile pasajlamada kullanılacak besiyerinde merkezdeki küçük bir agar bloğu (5mm²) kesilip çıkartılır. Aynı bistüri kullanılarak benzeri büyüklükteki ve şekildeki agar fungal hifayı da içerecek şekilde pasajlanacak olan koloninin kenarından kesip çıkartılır.
- Bu agar bloğu pasajın yapılacağı besiyerine mantarlı kısmı yukarıda olacak şekilde dikkatlice yerleştirilir. Kesilen hifa rejener olup bloğun yüzeyinden çevreye doğru üreyecektir.

Mantar Kolonilerinin Mikroskopik Muayenesi

- Dissecting microscope ile inceleme
- LPCB
(Lactophenol Cotton Blue / Laktofenol Pamuk Mavisi)
ile lam lamel arasına preparat hazırlama
(wet mount method)
ile inceleme
- Yapışkan seloteyp yöntemi
- Lam Kültür Tekniği



Seloteyp Yöntemi



c-) Mantarların İdentifikasyonu

- Klinik örnekte mantarın direkt mikroskopik görüntüsü
- Koloni morfolojisi ve pigmentasyon tipi
- Mantar kolonilerinde makrokonidia (fruiting heads) ve sporların mikroskopik görüntüsü
- Maya morfolojisi ve tomurcuklanma şekli
- Mayalar ve daha az oran ve sıklıkta mantarlar için için biyokimyasal testler
- *Candida albicans* için germ tube testi gibi etkene spesifik testler
- Spesifik serolojik testler
- Kontaminantların durumu !!!

Mikolojide Güvenlik Koşulları



- Hayvanlarda hastalığa yol açan mantarların çoğu insanlar için de patojeniktir
- Özellikle patojenik mantar içerdiği düşünülen materyal ve kültürler ele alınırken çok dikkatli olunmalıdır!!!
- Özellikle *Coccidioides immitis* gibi 25 ve 37°C'lerde yüksek oranda infektif arthrosporlar oluşturan ve kolaylıkla aerosolize olabilen patojenlere karşı çok dikkatli olunmalıdır.
- *Cryptococcus neoformans* ve *Blastomyces dermatitidis* gibi dimorfik mantarlar insanlarda çok ciddi hastalığa yol açmaktadır.
- İdeal olan bütün mikolojik muayenelerin biyogüvenlik kabini içerisinde yapılmasıdır.